

Identitätsbestätigung von Adeno-assoziierten Viren in der Biopharmazie durch LC/MS



Adeno-assoziierte Viren (AAV) haben ihre eigenen kritischen Qualitätsmerkmale, viele der herkömmlichen Assays zur Überwachung etablierter Therapeutika auf Proteinbasis können jedoch weiterhin verwendet werden. AAV-Kapside bestehen aus ungefähr 60 Kopien der drei Proteine VP1, VP2 und VP3, die in einem stöchiometrischen Verhältnis von etwa 1:1:10 vorliegen.¹ Die chromatographische Trennung dieser drei Proteine ist aufgrund der hohen Sequenzhomologie schwierig, da alle drei aus demselben Gen gespleißt werden. SDS-PAGE-Gele mit Silberfärbung oder auf Antikörpern basierende Nachweismethoden wie ELISA und Immunblots wurden in der Vergangenheit verwendet, um das Verhältnis der drei Kapsidproteine zueinander zu bestimmen. Diese Verfahren sind jedoch umständlich und fehleranfällig und erfordern u. U. die Herstellung neuer Antikörper, die für die einzelnen AAV-Typen spezifisch sind. Die Herstellung von Antikörpern mit der für die Unterscheidung erforderlichen Spezifität kann sich angesichts des hohen Homologiegrads zwischen den AAV-Serotypen als schwierig erweisen. Mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS) lassen sich diese Herausforderungen dank Verbesserungen bei der Geschwindigkeit, Spezifität und Präzision meistern. Agilent bietet Workflow-Lösungen für das Mapping sowohl von intakten Proteinen als auch von Peptiden zur Identifizierung und Lokalisierung posttranslationaler Modifikationen (PTM).

Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) verlangt, dass AAV-Produkte vor der Freigabe eindeutig identifiziert werden müssen, insbesondere in Einrichtungen, in denen mehrere Serotypen oder modifizierte Varianten hergestellt werden.² Das Peptid-Mapping ist eine wesentliche Methode zur Bestimmung von Proteinsequenzen und zur Identifizierung von PTM und wird daher von der ICH, der amerikanischen FDA und anderen Aufsichtsbehörden für etabliertere Biotherapeutika vorgeschrieben. Während die Bestimmungen für Gentherapien mit AAV noch im Entstehen begriffen sind, könnte das Peptid-Mapping in Zukunft erforderlich sein.

Bisherige LC/MS-Arbeiten zur Bestätigung der Identität und relativen Abundanz intakter Kapsidproteine hatten mit einer schlechten chromatographischen Auflösung zu kämpfen. Koeluiierende Proteine erschweren die exakte Massenbestimmung, und aufgrund der Ähnlichkeit einiger AAV-Kapsidproteine (z. B. unterscheiden sich AAV1 und AAV6 nur um sechs Aminosäuren³) sind genaue Messungen für die Identitätsbestätigung von entscheidender Bedeutung.

Die ZORBAX weitporigen RRHD-Säulen von Agilent sind die Antwort auf diese Herausforderung bei der Analyse intakter Proteine. Sie bieten eine gute chromatographische Trennung, die die exakte Massenbestimmung per massenspektrometrischer (MS) Detektion ermöglicht.

- Die Partikelgröße von unter 2 µm bewirkt eine hohe Auflösung.
- Die weiten Poren ermöglichen einen guten Stofftransport für effiziente Trennungen.
- Eine Drucktoleranz bis 1200 bar unterstützt hocheffiziente UHPLC-Methoden.
- Der Diphenyl-Phasentyp bietet eine einzigartige Selektivität für anspruchsvolle Trennungen.

Agilent AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen wurden entwickelt, um Peptid-Maps mit hoher Auflösung für die Proteinidentifizierung und die Bestimmung von posttranslationalen Modifikationen zu erstellen.

- Oberflächenporöse Partikel ermöglichen hochauflösende Trennungen bei geringem Rückdruck.
- Eine gute Peakkapazität mit Ameisensäurehaltigen mobilen Phasen verbessert die MS-Empfindlichkeit gegenüber TFA-haltigen mobilen Phasen.

Bewährte Verfahren für eine effektive AAV-Analyse

Probenvorbereitung

- Viele rekombinante Proteine werden in nicht flüchtigen Puffern mit einem vergleichsweise hohen Gehalt an Salz und stabilisierenden Zusätzen wie Poloxamere formuliert, was die MS-Detektion stört und zu schneller Verschmutzung des Geräts führt. Ein Austausch des Probenpuffers vor der LC/MS-Analyse kann die Spektrqualität erheblich verbessern und die Zeiträume zwischen MS-Wartungen verlängern. Beachten Sie, dass der Pufferaustausch zur Instabilität der Probe führen kann, und planen Sie daher die Analyse der Proben direkt nach dem Pufferaustausch ein.
- Für kleine Probenvolumina werden High-Recovery-Probenflaschen empfohlen.

Chromatographische Trennung

- Verringern Sie die Anstiegsrate des Durchflusses von der Standardeinstellung auf 1 ml/min² oder weniger. Der allmähliche Anstieg der Flussrate verlängert die Lebensdauer der Säule und trägt dazu bei, plötzlichen Überdruck zu vermeiden. Die Einstellung finden Sie im Abschnitt Advanced (Erweitert) für die LC-Pumpensteuerung in der Agilent Software.
- Stellen Sie die maximale Druckbegrenzung in der LC-Methode so ein, dass er dem der Säule entspricht (600 bar für AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen, 1200 bar für ZORBAX RRHD-Säulen). Dies ist immer dann wichtig, wenn die maximale Druckkapazität des LC die der Säule übersteigt.
- Minimieren Sie das Totvolumen des Systems, um die Auflösung zu maximieren. Zur Minimierung des Totvolumens wird ein System mit geringem Totvolumen empfohlen, wie z. B. ein Agilent 1290 Infinity II, das mit [Kapillarleitungen für ultra-niedrige Dispersion](#)⁴ ausgestattet ist.

Massenspektrometrie

- Leiten Sie den LC-Fluss außerhalb der relevanten Retentionszeit(en) in den Abfall um, insbesondere während einer Spülung mit hohem organischen Anteil am Ende der Methode und, wenn möglich, während das Leervolumen eluiert.
- Verwenden Sie Lösungsmittel in HPLC- oder höherer Qualität.
- Führen Sie eine regelmäßige Reinigungsroutine für die MS-Quelle ein.

Erste Schritte – Intakte Kapsidproteine

Die Analyse intakter Kapsidproteine wird in der Application Note [5994-2434EN](#) ausführlicher beschrieben, in der verschiedene Säulen-Phasentypen aus der ZORBAX RRHD-Familie für die Trennung von VP1-, VP2- und VP3-Kapsidproteinen verglichen werden.⁵ Der Arbeitsablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

Kriterien für die Säulenauswahl - Intakte Kapsidproteine

Bei der Auswahl einer Umkehrphasen-Säule, insbesondere für AAV-Kapsidproteine, ist es sinnvoll, sowohl die verwendete Nachweismethode als auch die über die Probe bekannten Daten zu berücksichtigen. AAV-Proben sind oft stärker verdünnt als andere Proben rekombinanter Proteine. Wählen Sie Säulen, die hohe Empfindlichkeit und Auflösung bieten, zwei Parameter, die in der Vergangenheit eine Herausforderung bei der Trennung von VP1-, VP2- und VP3-Kapsidproteinen darstellten.

- **Säulenlänge:** Bei Umkehrphasen-Säulen kann eine größere Säulenlänge zu höherer Auflösung führen, sodass eine Länge von 100 oder 150 mm empfohlen wird.
- **Porengröße:** Intakte Proteine sind in Lösung relativ groß, insbesondere unter denaturierenden Umkehrphasenbedingungen. Große Poren sind erforderlich, um einen effizienten Stofftransport in und aus den Partikeln der stationären Phase zu gewährleisten, was wiederum die Auflösung verbessert. Wir empfehlen eine Porengröße von 300 Å.
- **Partikelgröße:** Kleinere Partikelgrößen erhöhen die Auflösung, daher werden 1,8-µm-RRHD-Säulen empfohlen.
- **Art der stationären Phase:** Die Selektivität der stationären Phase ist eine weitere Variable, die verändert werden kann, wenn es um die Auflösung interessierender Analyten geht. Stationäre Phasen mit kürzeren Alkylketten wie C4 oder C8 sind für intakte Proteine üblich, für VP1, VP2 und VP3 haben sich jedoch weniger intuitive Optionen als vorteilhaft erwiesen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen AAV-Serotypen unterschiedliche Anforderungen an die stationäre Phase nach sich ziehen. Die ZORBAX RRHD SB300-C18-Säule hat sich für AAV2 und AAV7 bewährt, während die ZORBAX RRHD 300-Diphenyl-Säule für mehrere andere Serotypen, einschließlich AAV9, gut geeignet ist.



Abbildung 1. Überblick über das Verfahren zur Bestätigung der Identität und zur Messung der relativen Mengen der einzelnen Kapsidproteine, die das intakte AAV-Kapsid bilden.

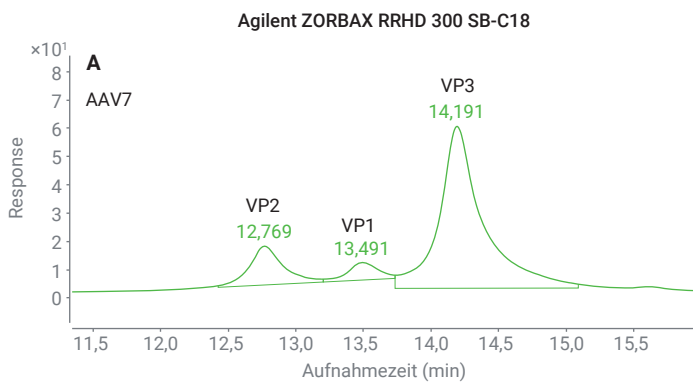


Abbildung 2: Trennung von AAV7 auf einer Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18-Säule unter Bedingungen, die in Tabelle 1 beschrieben sind.

Parameter	Wert	
Säule	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond-Säule C18, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (Best.-Nr. 858750-902)	
Gerät	Agilent 1290 Infinity II	
Flussrate	0,4 ml/min	
Mobile Phase A	0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA in Wasser	
Mobile Phase B	90 % Isopropanol, 9,8 % Wasser, 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA	
Gradient	Zeit (min)	% B
	0-5	28 %
	23	32,5 %
	23,5	80 %
26	80 %	
Nachlaufzeit	3 Minuten	
Säulentemperatur	80 °C	

Tabelle 1: Für die Analyse intakter Kapsidproteine verwendete Startbedingungen. Einzelheiten finden Sie in Application Note⁵ [5994-2434EN](#).

Erste Schritte – Peptid-Mapping

Die Peptid-Mapping-Analyse von AAV-Kapsidproteinen unter Verwendung der AdvanceBio Peptide Mapping-Säule ist in den Application Notes [5994-1980EN](#) und [5994-2434EN](#) beschrieben.

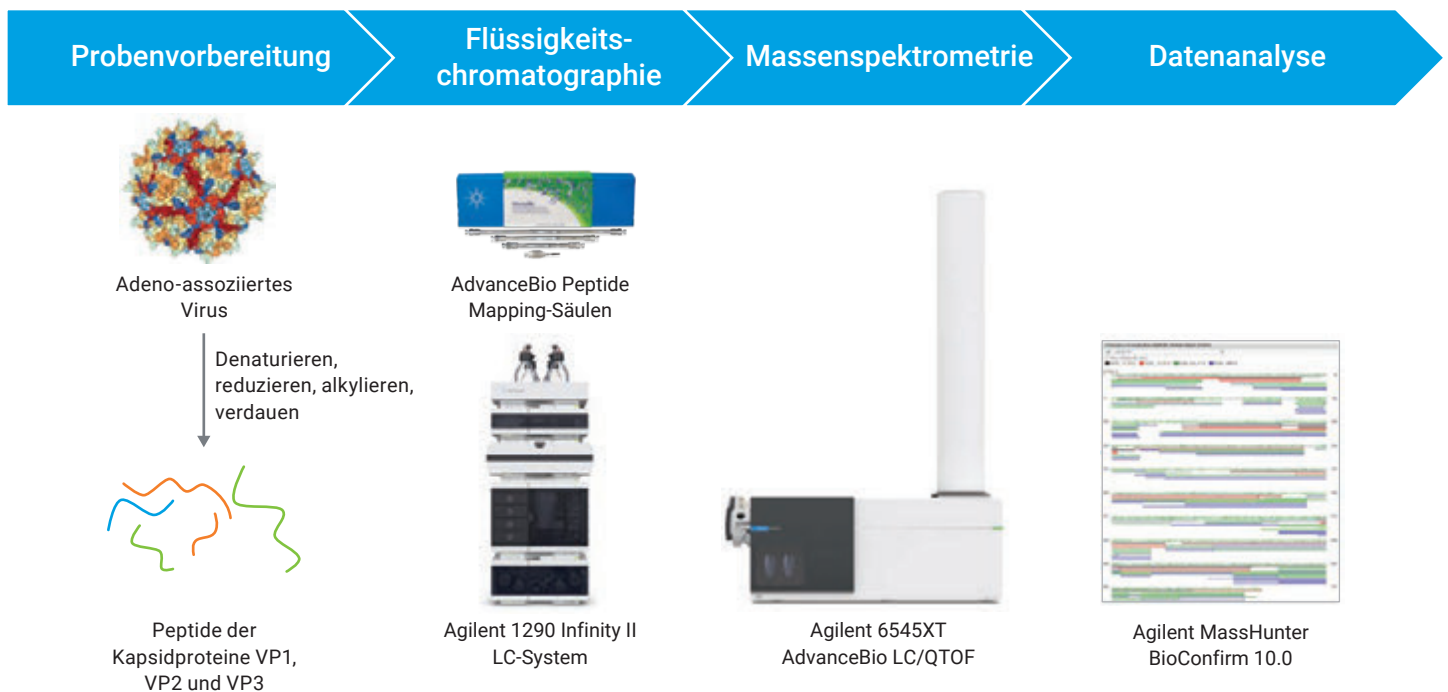


Abbildung 3: Überblick über den Prozess zur Bestätigung der Primärstruktur und der Identifizierung posttranslationaler Modifikationen eines Kapsidproteins.

Kriterien für die Säulenauswahl – Peptid-Mapping

Ebenso wie bei der Analyse intakter Kapsidproteine sollte man sich bei der Säulenauswahl von den Informationen zur Probe und der Nachweismethode leiten lassen. Dieselben Herausforderungen an Empfindlichkeit und Auflösung stellen sich auch bei Peptid-Mapping-Trennungen verdauter AAV. In diesem Fall, wo sich das Kapsid aus drei eng verwandten Proteinkomponenten zusammensetzt, ist die Peptid-Mapping-Trennung sogar noch komplizierter, als dies bei verdauten rekombinanten Proteinen üblicherweise der Fall ist.

- **Säulendurchmesser:** Im Hinblick auf Empfindlichkeit und Kompatibilität mit der MS-Detektion wird eine 2,1-mm-Säule anstelle von Säulen mit größerem Innendurchmesser empfohlen. Die mit 2,1-mm-Säulen verwendete Flussrate begünstigt eine effiziente Elektrospray-Ionisierung, was ebenfalls die Empfindlichkeit verbessert.
- **Säulenlänge:** Bei Umkehrphasensäulen kann eine größere Säulenlänge zu höherer Auflösung führen. Empfohlen wird eine Säule mit einer Länge von 150 mm oder mehr.
- **Partikelgröße und -typ:** Kleinere Partikel ergeben im Allgemeinen eine höhere Auflösung, jedoch bieten etwas größere oberflächenporöse Partikel die gleiche Auflösung bei weitaus geringerem Rückdruck. Empfohlen wird ein oberflächenporöser Partikel mit einer Porengröße von 2,7 µm.
- **Art der stationären Phase:** Stationäre C18-Phasen werden am häufigsten für das Peptid-Mapping verwendet, es gibt allerdings eine große Bandbreite von C18-Säulenoptionen. Für das Peptid-Mapping eignet sich am besten eine Kombination aus Säule und Mobilphasen-System, das schmale Peaks mit geringem Tailing ergibt, um die Peakkapazität zu optimieren. Wichtig ist außerdem, die richtige Balance zwischen der Retention kleiner hydrophiler Peptide und einer ausreichenden Elution von langen hydrophoben Peptiden zu erreichen.

Die hier empfohlene AdvanceBio Peptide Mapping-Säule erfüllt genau diese Kriterien.

Parameter	Wert
Säule	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. 653750-902)
Gerät	Agilent 1290 Infinity II
Flussrate	0,4 ml/min
Mobile Phase A	0,1 % Ameisensäure in Wasser
Mobile Phase B	0,1 % Ameisensäure in Acetonitril
Gradient	Zeit (min) % B
	0-3 3 %
	50 35 %
	60 97 %
	62 97 %
	62,5 3 %
	65 3 %
Nachlaufzeit	5 Minuten
Säulentemperatur	60 °C

Tabelle 2: Startbedingungen für das Peptid-Mapping. Einzelheiten finden Sie in Application Note⁶ [5994-1980EN](#).

Literatur

1. Backovic, A. et al. Capsid Protein Expression and Adeno-Associated Virus like Particles Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microb. Cell Fact* 2012, 11, 124.
2. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. US Food and Drug Administration 2020.
3. Kuck, D.; Kern, A.; Kleinschmidt, J. A. Development of AAV SerotypeSpecific ELISAs Using Novel Monoclonal Antibodies. *Journal of Virological Methods* 2007, 140, 17–24.
4. [Agilent 1290 Infinity II Ultra Low Dispersion Kit Technical Note](#)
5. LC/MS of Intact Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Proteins for Product Identity ([5994-2434EN](#))
6. Characterization of Viral Vector Particles Using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF ([5994-1980EN](#))

Informationen für eine einfache Auswahl und Bestellung

Zur Bestellung der in den folgenden Tabellen zusammengefassten Artikel im Agilent Online Store nehmen Sie die gewünschten Artikel in Ihre Liste von Produktfavoriten auf. Klicken Sie dazu auf die MeineListe-#-Links in den Überschriften. Geben Sie dann die Stückzahl der gewünschten Artikel ein, fügen Sie sie dem Warenkorb hinzu und gehen Sie zur Kasse. Ihre Liste bleibt für zukünftige Bestellungen in Ihren Favoriten gespeichert.

Wenn Sie „Produktfavoriten“ zum ersten Mal benutzen, werden Sie zur Eingabe Ihrer E-Mail-Adresse aufgefordert, um das Kundenkonto zu bestätigen. Wenn Sie bereits über ein Agilent Konto verfügen, können Sie sich einfach anmelden. Wenn Sie noch kein Agilent Konto eingerichtet haben, müssen Sie sich für eines registrieren. Diese Funktion ist nur in Regionen verfügbar, in denen E-Commerce möglich ist. Alle Artikel können auch über die üblichen Verkaufs- und Vertriebskanäle bestellt werden.

MeineListe 1: Agilent ZORBAX RRHD-Säulen für die Analyse intakter Proteine

Beschreibung	Best.-Nr.
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm, 300 Å	863750-944
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm, 300 Å	858750-944
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18 2,1 x 150 mm, 1,8 µm, 300 Å	863750-902
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18 2,1 x 100 mm, 1,8 µm, 300 Å	858750-902

MeineListe 2: AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen für die Analyse auf Peptid-Ebene

Beschreibung	Best.-Nr.
AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm	653750-902
AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 250 mm, 2,7 µm	651750-902
AdvanceBio Peptide Mapping-Vorsäule, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, 3 St.	851725-911

MeineListe 3: Standards

Beschreibung	Best.-Nr.
Agilent NIST mAb, 25 µl	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 x 25 µl	5191-5745
Standard, zehn Peptide, 71 µg, lyophilisiert	5190-0583
HSA-Peptidstandard	G2455-85001

MeineListe 4: Zubehör, Verbrauchsmaterialien und Lösemittel

Beschreibung	Best.-Nr.
Verbindungen und Leitungen	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting-Einheit mit vormontierter 0,12 x 105 mm Kapillare (für den Anschluss am Säuleneinlass)	5067-5957
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (für den Anschluss am Säuleneinlass)	5067-5966
Quick Turn Kapillare Edelstahl 0,12 x 280 (für Quick Turn Fitting)	5500-1191
Montagewerkzeug für Quick Turn Fittings	5043-0915
Kit für Inline-Druckbegrenzungsventil	
(Zu verwenden, wenn ein anderer Detektor in Reihe nach der Fluoreszenz-Durchflusszelle eingesetzt wird)	G4212-68001
Kapillarenkit für ultra-niedrige Dispersion für Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Kapillarenkit für ultra-niedrige Dispersion für Agilent 1290 Infinity II Bio	5004-0007
Probenbehälter	
High-Recovery-Probenflasche, Schraubverschluss, mit festem Einsatz, klar, 300 µl Einsatzvolumen, 100 St. Probenflaschengröße: 12 x 32 mm (12 mm-Deckel)	5188-6591
Deckel, Schraubverschluss, blau, Septa aus PTFE/rotem Silikon, 100 St. Deckelgröße: 12 mm	5182-0717
Probenflasche, Bördel-/Schnappverschluss, Polypropylen, 250 µl, 1.000 St. Probenflaschengröße: 12 x 32 mm (11 mm-Deckel)*	5190-3155
Schnappverschlusskappe, klar, Septen aus PTFE/Silikon/PTFE, 100 St. Deckelgröße: 11 mm (für 5190-3155)	5182-0566
InfinityLab 96-Wellplate, 0,5 ml, 30 St.	5043-9310
InfinityLab 96-Wellplate-Dichtungsmatte, 50 St.	5042-1389
Lösemittel und Additive	
InfinityLab Reinstwasser für LC/MS, 1 l	5191-4498
InfinityLab Ultrapure Acetonitril für LC/MS, 1 l	5191-4496
Ameisensäure, 5 ml	G2453-85060
Lösemittelfiltration	
InfinityLab Lösemittelfiltereinheit	5191-6776
InfinityLab Lösemittelfilterflasche, Glas, 2 l	5191-6781
Filtermembran, Nylon 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4341
Filtermembran, regenerierte Cellulose, 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4340
Glasfilter für Lösemittelflasche, Lösemiteleinlass, 20 µm	5041-2168
Lösemittelhandhabung	
InfinityLab Stay Safe Verschlusskappe, Starter-Kit	5043-1222
InfinityLab Lösemittelflasche, klar, 1 l	9301-6524
InfinityLab Lösemittelflasche, braun, 1 l	9301-6526
Lösemittelflasche, klar, 2 l	9301-6342
Lösemittelflasche, braun, 2 l	9301-6341
InfinityLab Stay Safe Spülflasche	5043-1339
InfinityLab Abfallbehälter, GL45, 6 l mit Stay Safe Verschlusskappe	5043-1221
InfinityLab Aktivkohlefilter mit Zeitstreifen, 58 g	5043-1193

*Polypropylen-Probenflaschen sind chemisch beständig und ideal für pH-empfindliche Proben.

Weitere Informationen:

www.agilent.com/chem/aav-analysis

Hier finden Sie Ihr Agilent
Kundeninformationszentrum
in Ihrem Land:

www.agilent.com/chem/contactus

Deutschland

0800-603 1000

CustomerCare_Germany@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asien und Pazifik

inquiry_lsca@agilent.com

RA44707.6978009259

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Gedruckt in den USA, 8. Juni 2022
5994-4829DEE

